



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ Übersetzung der
europäischen Patentschrift

⑨7 EP 0 994 726 B 1

⑩ DE 697 12 110 T 2

⑤ Int. Cl.⁷:
A 61 K 47/48

②1	Deutsches Aktenzeichen:	697 12 110.0
⑧6	PCT-Aktenzeichen:	PCT/GB97/01859
⑨6	Europäisches Aktenzeichen:	97 930 669.3
⑧7	PCT-Veröffentlichungs-Nr.:	WO 98/01160
⑧6	PCT-Anmeldetag:	10. 7. 1997
⑧7	Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung:	15. 1. 1998
⑨7	Erstveröffentlichung durch das EPA:	26. 4. 2000
⑨7	Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA:	17. 4. 2002
④7	Veröffentlichungstag im Patentblatt:	12. 12. 2002

③0 Unionspriorität:

9614441	10. 07. 1996	GB
9614471	10. 07. 1996	GB

⑦3 Patentinhaber:

West Pharmaceutical Services Drug Delivery &
Clinical Research Centre Ltd., Nottingham, GB

⑦4 Vertreter:

Strohschänk und Kollegen, 81667 München

⑧4 Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU,
MC, NL, PT, SE

⑦2 Erfinder:

ILLUM, Lisbeth, Nottingham NG7 1BA, GB

⑤4 ZUSAMMENSETZUNGEN ZUR EINFÜHRUNG VON GENEN IN EPITHELZELLEN

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 697 12 110 T 2

DE 697 12 110 T 2

18.07.00

697 12 110.0-08

W 20 – S/gh

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung eines nicht-viralen Vektors basierend auf einem kationischen Polymer, nämlich Chitosan (Polyglucosamin).

Die Gentherapie stellt eine wichtige Möglichkeit der medizinischen Behandlung dar. Das Einführen eines geeigneten Gens in Zellen *in vitro* und *in vivo* könnte nützlich sowohl bei der Behandlung von genetischen Erkrankungen als auch als Mittel zur Erzeugung von komplexen medikamentösen Wirkstoffen im Körper sein. Eine Vielzahl von Anwendungen für die Gentherapie wurde in Übersichten dieses Gegenstandes beschrieben (siehe z.B. Evans et al., 1995, British Medical Bulletin 51, 226 – 234 und Wolff (Herausgeber) Gene Therapeutics, Methods and Applications of Direct Gene Transfer, Birkhauser 1994).

Ein Hauptproblem bei der Gentherapie ist die wirksame Abgabe des DNA-Konstrukts an das Zielorgan und die Aufnahme der DNA in die geeigneten Zellen, so dass als Ergebnis eine Expression erfolgen kann. Tatsächlich wurde die Notwendigkeit für neue Zuführsysteme als ein Hauptpunkt der erfolgreichen Gentherapie identifiziert (siehe beispielsweise Wilson, 1993, Nature 365, 691, Ledley, 1994, Current Opinion in Biotechnology 5, 626 – 636). Solche Gen-Zuführ- bzw. -Abgabe-Systeme werden häufig als „Vektoren“ bezeichnet. Diese Vektoren können in zwei Hauptarten unterteilt werden, nämlich virale und nicht-virale Vektoren (siehe z.B. Schofield und Caskey, 1995, British Medical Bulletin 51, 56 – 71).

Eine große Anzahl nicht-viraler Vektoren wurde im Stand der Technik beschrieben. Hierzu gehören monokationische Lipide wie z.B. DOTMA (N[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid sowie kationische Polymere. Das am besten bekannte Polymer für eine Genzufuhr ist Polylysin, von dem jedoch bekannt ist, dass es toxisch ist. Es wurde beschrieben, dass andere kationische Polymere komplexe Strukturen umfassen, wie z.B. Dendrimere (Haensler und Szoka, 1993, Bioconjugate Chem. 4, 372 – 379).

Gentherapiemodelle mit erhöhter anti-entzündlicher Peptid-Expression für die Behandlung von Darmentzündungen einschließlich einer entzündlichen Darmerkrankung wurden beschrieben (Pizarro, TI, 1996; IBC Conference of Inflammatory Bowel Disease, Juni 3, 1996, Philadelphia, USA). Der Einsatz der Gentherapie in der Gastroenterologie wurde übersichtsmäßig von Dandha und Lemoine zusammengestellt (1996, Gut 38, 141 – 145). Der Stand der Technik enthält verschiedene Beschreibungen von Verfahren für die Abgabe von Genprodukten an den Magendarmtrakt unter Verwendung nicht-viraler Vektoren. Zu diesen gehörten auch Liposomsysteme, die durch rektale Infusion verabreicht wurden (Westbrook et al., 1994, Human Molecular

16.07.02

Genetics 3, 2005 – 2010) sowie durch sich langsam auflösende Kapseln (WO 93/19660).

Im allgemeinen war das Ausmaß der Expression bei der Abgabe von DNA an epitheliale Oberflächen nur gering und in manchen Fällen wurden die Ergebnisse durch die Verwendung eines ungeeigneten Reporter-Gens unrichtig. Beispielsweise kann die Expression von Beta-Galactosidase im Magendarmtrakt in sehr starkem Maße durch endogene Pegel des Enzyms und andere Faktoren beeinflusst werden, die zu falschen positiven Ergebnissen führen. Das Marker-CAT (Chloramphenicolacetyltransferase) wird aufgrund seines bakteriellen Ursprungs als guter Reporter für die Expression betrachtet.

Wir haben überraschender Weise gefunden, dass es möglich ist, ein erhöhtes Maß der Expression in epithelialen Geweben eines Modelltiers (des Kaninchens) durch die Komplexation von DNA mit dem Material Chitosan (Polyglucosamin) zu erzielen. Chitosan wurde in unseren früheren Patentanmeldungen als neues Material für die Verstärkung der Aufnahme von Peptiden und polaren Molekülen mit kleinem Molekulargewicht durch biologische Membranen hindurch beschrieben, das zu einem verbesserten therapeutischen Effekt führt (siehe auch Illum et al., 1994, Pharmaceutical Research 11, 1186 – 1189, Artursson et al., 1994, Pharmaceutic Research 11, 1358 – 1361). Komplexe zwischen Chitosan und therapeutischen Wirkstoffen wie z.B. Polypeptid-Medikamenten wurden ebenfalls beschrieben (PCT/GB90/00291). Komplexe zwischen Chitosan und DNA wurden für eine Verwendung bei der Zuführung von DNA an Zellen für die Expression von Polypeptiden beschrieben, um als Antigene zu dienen (GB 96/03019), oder als medikamentöser Wirkstoff (WO 96/05810). Die dabei erzielten Expressions-Pegel wurden jedoch nicht völlig charakterisiert und die Komplexe wurden nicht für die Abgabe und Expression von DNA optimiert. Die in WO 96/05810 beschriebenen Beispiele wurden durch Sprühtrocknen, Emulgierung, Lösemittelverdampfung oder Ausfällung durch Exposition an alkaline Konditionen mit oder ohne Quervernetzung zubereitet. Verfahren zur Zubereitung von Mikroteilchen, die Chitosan und DNA umfassen, sind in GB 96/03019 nicht im einzelnen beschrieben.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass diese dem Stand der Technik entsprechenden Verfahren nicht verwendet werden konnten, um Verbindungen zuzubereiten, die eine integrale Mischung von DNA und Chitosan enthielten, die sich in der Form von Nanopartikelchen befinden und somit von den Zellen wie z.B. epithelialen Zellen leicht aufgenommen werden können.

Die Kondensation von Plasmid-DNA durch kationische Polymere einschließlich Chitosanen unterschiedlichen Molekulargewichts wurde von Mumper et al. in Proc. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., 22, 325, 1995 beschrieben. Diese Studien waren in vitro-Untersuchungen, die auf die Wechselwirkung von verdichteter DNA mit Muskelzellen gerichtet waren. Die physiochemische Bewertung des Chitosan-DNA-Komplexes wird ebenso beschrieben wie die weiche in vitro-Transfektion einer Muskel-Zelllinie

(Myozyt). Es wurden keine in vivo-Daten geliefert. Noch wichtiger ist, dass weder erwähnt noch angeregt wird, dass Chitosan:DNA-Komplexe von speziellem Nutzen für die Transfektion von epithelialen Zellen und insbesondere für die Transfektion von Zellen und Strukturen sein könnten, die eine wichtige Rolle bei der Schleimhaut-Immun-Reaktion spielen.

JP-A-3198782 beschreibt einen Komplex aus einem Gen und einem Träger, der aus Chitosan mit niederem Molekulargewicht zusammengesetzt ist. Dieser Komplex kann verwendet werden, um das Gen in eine Zelle einzuschleusen.

Die Ausbildung eines Polyelektrolyt-Komplexes und eines N,N,N-trimethyl-Chitosan/Galactose-Kunjugats und DNA wird von Murata, J-I et al., in Carbohydrate Polymers, Band 29, No. 1, 1996, Seiten 69 – 74 beschrieben. Die Verwendung dieses Komplexes als Genzuführungswerkzeug wurde ebenfalls untersucht.

Ein Nanokügelchen-Abgabeträger, der durch die Komplex-Coadzervation von DNA und Chitosan hergestellt wird, wird bei Mao, H-Q, Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., 23., 1996, Seiten 401 und 402 beschrieben.

WO 98/01162 beschreibt ein Genabgabesystem, das aus enzymatisch abbaubaren polymeren Kationen und Nukleinsäure-Nanokügelchen optional mit einem Vernetzungszusatz oder einem an der Oberfläche befestigten Ziel-Liganden besteht.

WO 97/42975 beschreibt Zusammensetzungen von auf Chitosan basierenden Verbindungen und Nukleinsäuren oder Oligonucleotiden, die für eine Abgabe an die Zelle geeignet sind.

Die vorliegende Erfindung sieht die Verwendung einer Verbindung vor, die einen Teilchenkomplex von Chitosan und Nukleinsäure umfasst, wobei der Komplex eine Größe zwischen 10 nm und 1 µm besitzt und eine Oberflächenladung trägt, für die Herstellung eines Medikamentes für die Abgabe der Nukleinsäure an die epitheliale Oberfläche eines Säugetiers oder Menschen, wobei die Nukleinsäure in der Lage ist, exprimiert zu werden und einen anti-entzündlichen Wirkstoff, einen anti-infektiösen Wirkstoff, Sucrose-Isomaltase, Lactase-Phlorizin-Hydrolase, Maltaseglucoamylase, einen medikamentösen Wirkstoff oder einen Antiwirkstoff für die Behandlung von Darmkrebs codiert.

Mikrokügelchen, die Nukleinsäure und Chitosan umfassen, werden dadurch zubereitet, dass die Nukleinsäure und das Chitosan so wie im folgenden beschrieben, miteinander gemischt werden, ohne dass die Notwendigkeit einer weiteren Behandlung besteht. Es wird angenommen, dass das Chitosan die Plasmid-DNA in ein Nanoteilchen mit einer Größe zwischen 10 nm und 1 µm verdichtet und dem verdichteten Material geeignete Oberflächeneigenschaften aufprägt, die zu einem guten Haften des Teilchens an der Oberfläche der Zielzelle führen, worauf ein Eindringen in die Zelle erfolgt, das eine Expression des codierten Materials nach sich zieht.

Es wird hier die Verwendung von Chitosan-Komplexen als nicht-virale Vektoren zur Verstärkung der Expression von Nukleinsäure in epitheliale Gewebe wie z.B. dem Magendarmtrakt, der Vagina, dem Rektum, dem Nasenhohlraum, den Lungen und dem Rachenhohlraum beschrieben. Unter „Nukleinsäure“ werden Nukleinsäuren, insbesondere DNA verstanden, einschließlich Oligonucleotiden mit mehr als 100 Basenpaaren, Plasmide oder Kosmide hiervon, aufgewickelt oder abgewickelt.

Überraschender Weise hat sich auch gezeigt, dass die hier beschriebenen Chitosan-Komplexe die Expression von Nukleinsäure in mesenterischen Lymphknoten im Magendarmtrakt und in Drainagelymphknoten in der Nase verstärken.

Die gemäß der vorliegenden Erfindung verwendeten Zusammensetzungen umfassen einen teilchenförmigen Komplex aus Chitosan und einer Nukleinsäure, wobei der Komplex eine Größe zwischen 10 nm und 1 µm besitzt und eine Oberflächenladung trägt, wobei die Nukleinsäure in der Lage ist, exprimiert zu werden und einen anti-entzündlichen Wirkstoff, einen anti-infektiösen Wirkstoff, Sucrose-Isomaltase, Lactase-Phlorizin-Hydrolase, Maltaseglucoamylase, einen medikamentösen Wirkstoff oder ein Gegenmittel für die Behandlung von Darmkrebs codiert.

Es ist bevorzugt, dass dann, wenn die Nukleinsäure DNA ist, die Oberflächenladung oberhalb von +10 mV für DNA:Chitosan-Verhältnisse zwischen 1:1 und 1:6 und oberhalb von +20 mV für alle anderen DNA:Chitosan-Verhältnisse liegt.

Die Größe des Nukleinsäure-Chitosan-Komplexes kann zwischen 10 nm und 1 µm, vorzugsweise zwischen 20 nm und 700 nm und besonders bevorzugt zwischen 50 nm und 500 nm liegen (hydrodynamischer Durchmesser wie er durch Photonen-Korrelations-Spektroskopie gemessen wird).

Unter dem Ausdruck „Chitosan“ verstehen wir Polyglucosamin und Oligomere von Glucosamin-Materialien mit unterschiedlichen Molekulargewichten und Graden der Acetylierung. Modifizierte Chitosane, insbesondere solche, die zu Polyethylenglycol konjugiert sind, werden von dieser Definition mit umfasst.

Chitosane mit niedriger und mittlerer Viskosität (beispielsweise CL113, G210 und CL110) können aus verschiedenen Quellen bezogen werden, zu denen folgende Lieferanten gehören: Pronova Biopolymer, Ltd., UK; Seigagaku America Inc., MD, USA; Meron (India) Pvt. Ltd., Indien; Vanson Ltd., VA, USA und AMS Biotechnology Ltd., UK.

Die beschriebenen Chitosan-Nukleinsäure-Komplexe können durch das folgende Verfahren zubereitet werden. Das Verfahren umfasst das Zusammenmischen der beiden Komponenten, das Mischungsverhältnis, die relativen Konzentrationen der Ausgangslösungen, das Verhältnis der beiden Komponenten, den pH-Wert, die Ionenstärke und die Temperatur, die so gewählt werden, dass in nicht erfinderischer Weise die erforder-

liche Teilchengröße und Ladung erzielt wird. Die Teilchengröße und –ladung können auf einfache Weise unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren ermittelt werden, wie sie im folgenden beschrieben werden. Die Mischungsrate, die relativen Konzentrationen der Ausgangslösungen, der pH-Wert, die Ionenstärke und die Temperatur können beispielsweise so, wie dies im folgenden beschrieben wird, als Teil eines Standard-Experimentalaufbaus geändert werden, um die Teilchengröße zu steuern. Die Verhältnisse der beiden Komponenten können auch verwendet werden, um die Größe und die Oberflächenladung zu steuern. Das Gewicht/Gewichts-Verhältnis zwischen der Nukleinsäure und dem Chitosan kann zwischen 1:1 und 1:25, vorzugsweise zwischen 1:2 und 1:20 und in besonders bevorzugter Weise zwischen 1:5 und 1:6 liegen.

Die Größe und die Größenverteilung des Nukleinsäure-Chitosan-Komplexes kann durch Photonen-Korrelation-Spektroskopie (PCS) unter Verwendung eines Malvern 4700 Submikron-Teilchen-Analysiersystems (Malvern Instruments, UK) mit einem PCS100 Spektrometer ermittelt werden. Die Proben werden mit destilliertem Wasser verdünnt und bei 25° C unter einem Streuwinkel von 90° gemessen. Die Größenverteilung wird durch einen Polydispersitätsindex (PI) charakterisiert.

Das Molekulargewicht des Chitosans beeinflusst die Größe des verdichteten Nukleinsäure-Komplexes und kann tatsächlich so gewählt werden, dass es die Größe des Komplexes beeinflusst. Zu diesem Zweck können Untersuchungen unter Verwendung der Ethidium-Bromid-Fluoreszenz durchgeführt werden, wie sie von Wolfert und Seymour, 1996, Gene Therapy 3, 269 – 273 beschrieben werden. Ethidium-Bromid tritt mit Nukleinsäure in Wechselwirkung, um starke Fluoreszenz zu erzeugen. Wenn ein komplexbildendes kationisches Polymer hinzugefügt wird, wird das Ethidium-Bromid aus dem Komplex heraus gedrückt und die Fluoreszenz vermindert. Ein Diagramm der Fluoreszenz über der Menge des hinzugefügten Polymers kann verwendet werden, um den Verdichtungsprozess abzuschätzen (Verlust an Fluoreszenz ist kennzeichnend für das Ausmaß der Verdichtung) und damit auch der Auswahl des geeigneten Molekulargewichts der komplexbildenden Chitosanart. Die Fluoreszenz kann beispielsweise unter Verwendung eines Perkin-Elmer 3000 Fluoreszenz-Spektrometers gemessen werden. Die optische Emissionswellenlänge wird auf 591 nm und die optische Erregungswellenlänge wird auf 366 nm eingestellt. Ethidium-Bromid (EtBr) wird in einer Küvette (Referenz) zu Wasser hinzugefügt, und Nukleinsäurelösung und Ethidium-Bromid werden in einer zweiten Küvette (Test) zu Wasser hinzugefügt. Die Fluoreszenz der Referenz-Küvette wird auf Null gesetzt. Die von der Test-Küvette erhaltene Fluoreszenz wird gemessen. Chitosan-Proben werden dann in sehr kleinen Portionen der Test-Küvette unter konstantem Rühren hinzugefügt und die Fluoreszenz-Ablesung wird drei Mal durchgeführt, wobei zwischen jeder Ablesung zur Null-Zelle zurückgekehrt wird. Der Mittelwert der drei Ablesungen wird dann aufgezeichnet.

Das Molekulargewicht des Chitosans liegt vorzugsweise zwischen 500 Dalton und 500.000 Dalton, in mehr bevorzugter Weise zwischen 700 Dalton und 250.000 Dalton und in besonders bevorzugter Weise zwischen 1.000 Dalton und 150.000 Dalton.

Chitosane mit unterschiedlichen geringen Molekulargewichten können durch enzymatischen Abbau von Chitosan unter Verwendung von Chitosanase oder durch das Hinzufügen von salpetriger Säure zubereitet werden. Beide Verfahren sind dem Fachmann wohl bekannt und werden in jüngeren Publikationen beschrieben (Li et al., 1995, Plant Physiol. Biochem. 33, 599 – 603; Allan und Peyron, 1995, Carbohydrate Research 277, 257 – 272; Damard und Cartier, 1989, Int. J. Biol. Macromol. 11, 297 – 302).

Es ist bevorzugt, dass der Komplex eine Oberflächenladung von mehr als +1 mV besitzt. Es ist noch mehr bevorzugt, dass die Oberflächenladung zwischen + 2 mV und +100 mV und in noch stärker bevorzugter Weise zwischen +5 mV und +60 mV und insbesondere zwischen +20 mV und +60 mV liegt.

Die Oberflächenladung der Teilchen wird als Zetapotential ausgedrückt. Dieses wird bei einem pH-Wert von 7,4 und einer Ionenstärke von 0,01 M ermittelt. Das Zetapotential wird durch Laser-Doppler-Anemometrie (LDA) beispielsweise unter Verwendung eines Malvern Zeta Sizer IV (Malvern, UK) gemessen. Die Laser-Doppler-Anemometrie umfasst die Detektion von Laserlicht, das von Teilchen gestreut wird, die sich in einem angelegten elektrischen Feld bewegen. Die verwendete Ausrüstung kann beispielsweise ein Malvern Zetasizer II (Malvern Instruments) sein.

Elektrophoretische Mobilitäts-Messungen werden dadurch ausgeführt, dass die Nukleinsäure-Chitosan-Komplexe in 10 ml Pufferlösung, wie z.B. Phosphat- oder McIlvaine-Puffer von 100 µg bis 1 mg mit einer konstanten Ionenstärke von 0,001 M dispergiert werden. Es werden vier Ablesungen unter Verwendung einer PC4-Weit-Kapillarzelle bei einer Spannung von 100 V, einem Elektrodenabstand von 50 mm und einer Dielektrizitätskonstante von 78,54 vorgenommen.

Die Nukleinsäure kann irgendeine Nukleinsäure sein. Vorzugsweise ist es DNA. Mehr bevorzugt handelt es sich um DNA-Oligonucleotide mit mehr als 100 Basenpaaren oder Plasmide oder Cosmide, die aufgewickelt oder nicht aufgewickelt sein können. Die Nukleinsäure ist in der Lage, exprimiert zu werden. Beispielsweise kann sie ein DNA-Expressions-Vektor wie z.B. ein Plasmid sein, der einen Einsatz in der richtigen Ausrichtung und im richtigen Leserahmen für die Expression durch die gewünschte Wirtszelle besitzt. Ein Beispiel für eine solche DNA ist das Reporter-Gen-Plasmid pCAT-DNA, das von einem CMV-Promoter gefördert wird, der von GeneMedicine, Houston, USA geliefert wird.

Die Nukleinsäure kann ein Genprodukt codieren, das als therapeutischer Wirkstoff für eine ererbte oder erworbene Krankheit wirken kann, wozu therapeutische Wirkstoffe für

die Behandlung von lokalen Zuständen, wie z.B. Morbus Crohn, Ulcerus-Colitis, Asthma, zystische Fibrose und Krebs gehören.

Beispiele umfassen anti-infektiöse Wirkstoffe, anti-entzündliche und prophylaktische Wirkstoffe. Genprodukte umfassen, ohne hierauf beschränkt zu sein, Alpha-1-Antitrypsin, Wachstumshormon-Synthase, Faktor VIII, Faktor IX, TNF, Cytokine, Antigen-Gene (Hepatitis B, Influenza, Cholera), den Transmembran-Conductance-Regulator für zystische Fibrose CTFR, Krebsgene (p53, K-ras, HS-Ek), Sucrose-Isomaltase, Lactase-Phlorizin-Hydrolase und Maltase-Glucoamylase.

Die hier beschriebenen Nukleinsäure-Chitosan-Zubereitungen können endothelialen Oberflächen oder in Gewebe, insbesondere die Muskeln oder in Körperbereiche wie die Gelenke und die Lunge (durch Aerosolisation) verabreicht werden. Sie können an epitheliale Oberflächen wie z.B. die des Nasenhohlraums, der Lungen (einschließlich jedes Lungenbereichs), der Vagina, des Uterus oder unterschiedlichen Bereichen des Magendarmtrakts (dem Rachenraum, der Speiseröhre, dem Magen, dem Dünndarm, dem Dickdarm (Cholon), zum Darm gehörenden Lymphoid-Gewebe (Peyerschen Flecken und Darm-Lymphfollikeln) oder dem Rektum) zugeführt werden. Insbesondere kann die epitheliale Oberfläche die Nasenschleimhaut, der Nase zugeordnetes lymphoides Gewebe (einschließlich der Mandeln und Waldayers Rachenring beim Menschen) sein. Weiterhin kann die epitheliale Oberfläche das Auge (d.h. die Hornhautoberfläche des Auges) oder das Innenohr sein.

Die Teilchen können unter Verwendung geeigneter Verabreichungsvorrichtungen abgegeben werden, wie sie dem Fachmann bekannt sind. Beispielsweise können im Handel zur Verfügung stehende Flüssigkeits- und Pulver-Sprühsysteme für die nasale Verabreichung verwendet werden, so z.B. bei flüssigen Systemen eine Nasensprühvorrichtung (Pfeiffer), die abgemessene Dosen abgibt, sowie der Monospray – nasale Flüssig-Einheitsdosis (Valois) oder Pulversysteme wie z.B. das Monopoudre (Valois), das Lyphodose (Valois), das Nasalet (Fisons), der Einzeldosen-Insufflator (Miat), der Turbuspin (PH&T) und das Unit-Dose-System (Bespak). Aerosolsysteme können für die Verabreichung an die Lungen verwendet werden (wozu Treibgasvorrichtungen, Trockenpulversysteme, Zerstäuber (Venturi und Ultraschall ebenso wie Extrusionssysteme)) gehören. Für die Verabreichung an die Vagina kann die Chitosan-Komplexzubereitung als Gel zubereitet und unter Verwendung einer spritzenartigen Vorrichtung verabreicht werden. Für das Rektum kann der Chitosan-Komplex als Zäpfchen oder als eine Suspension verabreicht werden, die mit Hilfe eines Klistiers zugeführt wird. Die Pulverzubereitungen können Systeme umfassen, bei denen das verdichtete Material in ein Mikrokügelchen eingebaut oder auf ein solches aufgebracht ist, das aus einem biokompatiblen und biologisch abbaubaren Material wie z.B. Polysaccharid, Stärke oder einer Modifikation hiervon, Albumin oder Gelatine zubereitet ist.

Die Zubereitungen können als Systeme mit sofortiger oder gesteuerter Freisetzung verabreicht werden. Systeme, die bei Berührung mit der Schleimhaut gelieren oder

eine Gelierung aufgrund einer Änderung der Umgebungsbedingungen erfahren, werden als besonders bedeutsam erachtet. Beispielsweise umfassen sie, ohne hierauf beschränkt zu sein, Gellan-Gummi, Xanthan, Alginat, synergistische Polymere. Eine ortsspezifische Abgabe kann unter Verwendung von Abgabesystemen erzielt werden, wie sie dem Fachmann bekannt sind. Beispielsweise wurden Zubereitungen, die Medikamente speziell an den Dickdarm abgeben, in unseren Patentanmeldungen WO91/11175 und WO95/35100 beschrieben.

Die Effizienz der Aufnahme durch die Zellen kann durch die gleichzeitige Verabreichung eines schleimlösenden Wirkstoffs wie z.B. Tyloxapol, N-acetylcystein (zur Ermöglichung eines besseren Zugangs zu den epithelialen Zellen) sowie durch das Hinzufügen von Beschichtungswirkstoffen erhöht werden, die verschiedene durch Lecithin geförderte Vorgänge ausnutzen, die für den Magendarmtrakt bekannt sind (beispielsweise Fimbrial-Haftstoffe, Tomato-Lecithin). Invasine stellen eine spezielle Klasse von zusätzlichen Materialien dar, die das Anhaften und die Aufnahme der Komplex-Teilchen in die epithelialen Zellen unterstützen können (siehe z.B. A.T. Florence, Pharm. Res., 14, 259, 1997).

Ein besseres Zurückhalten an einer epithelialen Oberfläche kann erzielt werden, wenn der Komplex an die Oberfläche eines größeren Mikrokügelchens gebunden ist. Der Ausdruck „Mikrokügelchen“ wird hier verwendet, um sowohl eine feste Matrix umfassende Mikrokügelchen als auch Mikrokapseln zu bezeichnen. Biologisch abbaubare Mikrokügelchen, die die geeignete Größe und Oberflächenladungsdichte besitzen, können aus einer Reihe unterschiedlicher Materialien zubereitet werden, wie z.B. aus löslicher Stärke, die Carboxylgruppen trägt, welche kovalent an die Stärke gebunden sind, sowie aus Polymeren, die ionisierende Gruppen enthalten, um eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen den positiv geladenen DNA-Konjugaten und den biologisch abbaubaren Mikrokügelchen zu ermöglichen. Solche Gruppen sind vorzugsweise Carboxyl- oder Sulfatgruppen. Solche polymeren Materialien umfassen die Alginate, Heparin und andere sulfatierte Polysaccharide (Carboxymethyldextran, Carboxydextran und Dextransulfat), sowie biologisch abbaubare synthetische Polymere wie z.B. Polylactidoglycerid und Polymilchsäure. In ähnlicher Weise kann eine physikalische Mischung aus Polymeren, die dann in Mikrokügelchen konvertiert wird, verwendet werden. Beispielsweise wurden bereits Heparin/Albumin-Mikrokügelchen für den Zweck der Medikamentenabgabe beschrieben (Kwon et al., 1991, J. Colloid Interface Sci., 143, 501 und Cremers et al., 1990 J. Controlled Release, 11, 167). Solche Materialien wurden nicht für die Verwendung bei der Gentherapie und nicht für die Beförderung von DNA-Konjugaten beschrieben.

Ebenso können die biologisch abbaubaren Mikrokügelchen aus quervernetzter löslicher Stärke, Albumin, Gelatin, Heparin, Carboxydextran, Dextran, Dextransulfat, Alginat, Polylactid oder deren Mischungen zubereitet werden.

16.07.03

Die biologisch abbaubaren Mikrokügelchen sollten vorzugsweise eine mittlere Größe (Durchmesser einer mittleren Anzahl, wie er durch Licht-Mikroskopie ermittelt wird) von mehr als 5 μm , vorzugsweise zwischen 6 und 200 μm und in besonders bevorzugter Weise zwischen 10 und 100 μm und noch stärker bevorzugt zwischen 12 bis 50 μm besitzen. Die Größe der hier beschriebenen biologisch abbaubaren Mikrokügelchen bezieht sich auf die Größe der vergrößerten Teilchen in dem für die intravenöse Verabreichung gewählten Beförderungsmittel.

Die Eigenschaften des Trägersystems können so konstruiert werden, dass sie unterschiedliche Abbauraten ergeben und dadurch den Berührungszeitraum zwischen dem Trägermikrokügelchen und der epithelialen Oberfläche steuern. Unterschiedliche Abbauraten können durch Verfahren erreicht werden, die dem Fachmann bekannt sind, wie z.B. durch Regulierung des Ausmaßes der Quervernetzung der Mikrokügelchen; weniger vernetzte Mikrokügelchen werden schneller abgebaut als Mikrokügelchen, die in einem höheren Maße quervernetzt sind. In ähnlicher Weise ist es für manche Polymere möglich, die Abbaurate durch die Auswahl von Polymerketten mit kleinerem Molekulargewicht für einen schnelleren Abbau und Polymerketten mit höherem Molekulargewicht für einen langsameren Abbau zu steuern. Bei Systemen, die durch Erhitzen quervernetzt werden, kann das Ausmaß der Quervernetzung und damit die Abbaurate durch die Zeitdauer der Erhitzung und die Temperatur gesteuert werden.

Geeignete Mikroteilchen für die Verwendung in den Zusammensetzungen sind im Handel verfügbar und umfassen Stärke-Mikrokügelchen (wie z.B. Cadoxamer (Perstorp) und Spherex (Pharmacia Upjohn)), Dextran-Mikrokügelchen (CM Sephadex (Pharmacia Upjohn) und SP Sephadex (Pharmacia Upjohn)) und Agarose-Mikrokügelchen (CM Sepharose (Pharmacia Upjohn) und S Sepharose (Pharmacia Upjohn)). Albumin- und Gelatin-Mikrokügelchen können nach Verfahren zubereitet werden, die dem Fachmann wohl bekannt sind.

Ein Beispiel für die Verabreichung von DNA-Chitosan-Zubereitungen an den Magen-darmtrakt von Kaninchen wird im folgenden beschrieben. Es umfasst eine Lapratomie (chirurgisches Einschneiden in den Bauch) und Erholung der Kaninchen. Vor jedem Untersuchungstag wird Fell vom Bauchbereich des entsprechenden Kaninchens unter Verwendung einer Haarschneidemaschine entfernt. An jedem Untersuchungstag werden die entsprechenden Kaninchen unter Verwendung einer Boyles-Vorrichtung/Halothan-Anästhesie anästhesiert. Die Anästhesie wird während des gesamten Vorgangs aufrechterhalten. Es wird ein Mittellinien-Schnitt mit einer Länge von 5 bis 8 cm durch die Haut gemacht, um den Abdomen freizulegen. Ein zweiter Mittellinien-Schnitt mit einer Länge zwischen 5 und 8 cm wird durch die White-Linie (zur Minimierung des operativen Blutverlustes) gemacht, die in Längsrichtung am Bauch des Kaninchens entlang läuft, um den Bauchhohlraum zu eröffnen. Die Gedärme werden freigelegt und der Dickdarm und der obere Teil des Dünndarms unter möglichst geringer Berührung der Därme identifiziert. Es ist erforderlich, einen Teil der Därme herauszu-

15.07.02

• holen, um einen klaren Zugang zum Dünndarm und Dickdarm für die Verabreichung einer Dosis zu erhalten.

Bei der Verabreichung an den Dünndarm wird die Dosis an den oberen Teil des Dünndarms in einem Abstand von ungefähr 10 cm von der Verbindung mit dem Magen verabreicht. Bei einer Verabreichung an den Dickdarm wird die Dosis dem Dickdarm in einem Abstand von ungefähr 5 cm von der Verbindung mit dem Blinddarm verabreicht.

Bei der Verabreichung einer Dosis wird ein geeignetes Dosis-Volumen direkt in den Hohlraum des entsprechenden Teils des Magendarmtraktes unter Verwendung einer sterilen Spritze und Nadel zugeführt. Beim Herausziehen der Nadel wird das Gewebe mit einem Tropfen Zyanoacrylat-Kleber versiegelt, um ein Austreten der Dosis zu verhindern. Es wird darauf geachtet, dass sichergestellt ist, dass der Zyanoacrylat-Kleber trocknet, bevor die hervorgeholten Därme in den Bauchhohlraum zurückgebracht werden, und dass die Därme ungefähr in ihrer natürlichen Position liegen. Der Bauchhohlraum wird mit zwei Schichten von Nähten geschlossen, eine durch die Bauchmuskulatur und die zweite durch die Haut. Die Kaninchen werden in einen geeigneten Käfigraum zurückgebracht und man lässt sie sich von den Wirkungen der Narkose erholen.

Weitere Beispiele sind die Abgabe von DNA an die Lungen zur Erzeugung von Transmembran-Conductance-Regulator für die zystische Fibrose (CFTR) für die Behandlung der zystischen Fibrose, oder die Abgabe von DNA an den nasalen oder vaginalen Hohlraum zur Erzeugung von therapeutischen Wirkstoffen für die Behandlung von örtlichen Zuständen wie z.B. von Entzündungen, der Behandlung von Allergien oder HIV, oder Wirkstoffen zur Verwendung als Empfängnisverhütungsmittel.

Ein weiterer Gesichtspunkt der Erfindung ist die Verwendung einer Verbindung gemäß der Erfindung in der Medizin.

Ein Gesichtspunkt der Erfindung ist die Verwendung einer hier beschriebenen Verbindung, bei der die Nukleinsäure Sucrose-Isomaltase, Lactase-Phlorizin-Hydrolase oder Maltase-Glucoamylase codiert, zur Zubereitung eines Medikaments für eine Verwendung bei der Behandlung von Disaccharid-Intoleranz.

Ein weiterer Gesichtspunkt der Erfindung ist die Verwendung einer hier beschriebenen Zusammensetzung, bei der die DNA einen medikamentösen Wirkstoff oder einen Gegenwirkstoff zur Herstellung eines Medikaments für die Behandlung von Dickdarmkrebs codiert.

Die vorliegende Erfindung wird nun noch mehr im einzelnen unter Bezugnahme auf die Zeichnung und Beispiele beschrieben.

In der Zeichnung zeigen:

- Fig. 1 eine kalibrierte Wärmefluss-Kurve von pCAT-DNA, das mit Chitosan titriert wurde,
- Fig. 2 CAT-Konzentrationen von Zellextrakten aus einer C6-Zelllinie, die mit pCAT-DNA aus verschiedenen Chitosan-Zubereitungen transfiziert wurden (Mittelwert \pm SD) und
- Fig. 3 CAT-Konzentrationen in Gewebeextrakten aus verschiedenen Bereichen des Magendarmtraktes von Kaninchen, Probengewebe 1 PP1; 2 PP2; 3 PP3; 4 EN1; 5 EN2; 6 EN3; 7 COL.

BEISPIEL 1: CAT-Analyse

Materialien

Das Reporter-Gen pCAT-DNA, das durch einen CMV-Promoter verstärkt wurde, wurde von GeneMedicine, Houston, USA geliefert. ApCAT-DOTMA-(N[1-(2,3-dioleoyloxy)-propyl]-NNN-trimethylammoniumchlorid)-Komplex wurde als Vergleichsmaterial verwendet. Dieses wurde zubereitet, wie durch Felgner et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. (UA) 84, 7415 – 7417 angegeben.

Verfahren

Eine Vergleichs-pCAT-DNA-Lösung wurde durch Verdünnen der pCAT-DNA-Vorratslösung (0,811 mg/ml) in autoclav-behandeltem PBS zubereitet. Zu 0,863 ml der pCAT-DNA-Vorratslösung wurden 13,137 ml der autoclavierten PBS hinzugefügt. Dies ergab 14,0 ml einer Vergleichs-pCAT-DNA-Lösung (0,05 mg/ml), die ausreichte, um sechs Kaninchen (bei 3 Tieren in den Dünndarm und bei drei Tieren in den Dickdarm) eine Dosis von 100 μ g von pCAT-DNA in einem Volumen von 2 ml zu verabreichen. Die Lösung wurde bei 4° C gelagert und 15 Minuten vor der Verabreichung an die Kaninchen auf Zimmertemperatur erwärmt.

Eine pCAT-DNA-DOTMA-Zubereitung, die in der Form von gefriergetrocknetem Pulver geliefert worden war, wurde am entsprechenden Untersuchungstag unter Verwendung von sterilem Wasser wiederhergestellt. Die sich ergebenden Flüssig-Zubereitungen enthielten eine ausreichende Konzentration von plasmider DNA, um eine Dosis von 100 μ g von pCAT-DNA in einem Volumen von 2 ml zu verabreichen. Die Zubereitung wurde bei 4° C gelagert und 15 Minuten vor der Verabreichung an die Kaninchen auf Zimmertemperatur erwärmt.

CAT-ELISA

Das CAT-ELISA-Verfahren für die Analyse von CAT in den Transfektions-Zellproben und den Tiergeweben wurde entsprechend dem Protokoll durchgeführt, das vom Hersteller des Ausrüstungssatzes (Boehringer Mannheim) geliefert wird. Die Studie basiert auf dem Sandwich-ELISA-Prinzip, bei dem der Anti-CAT-Antikörper an die Oberfläche der Mikrotiter-Plättchen-Module vorgebunden wird, das CAT-Enzym in den transfizierten Zellen und den Geweben bindet sich speziell an die immobilisierten Anti-CAT-Antikörper und der digoxigenin-gekennzeichnete Antikörper für CAT (Anti-CAT-DIG) bindet sich an das CAT-Enzym. Der Erkennungsantikörper, peroxidase-konjugierter Anti-Digoxigenin-Antikörper (Anti-DIG-POD) bindet sich an Digoxigenin. Im Endschrift wird das Peroxidasesubstrat (ABTS; 2,2'-Azinobis[3-ethylbenthiazolin-sulfonsäure]) durch Peroxidase katalysiert, was ein Farb-Reaktionsprodukt ergibt, das durch die Verwendung eines Substratverstärkers verstärkt wird. Die Absorptionsfähigkeit dieser Farbe ist dann direkt mit der Menge des in den Standards und den Extrakten vorhandenen CAT-Enzyms korreliert.

Gültigmachung von CAT-ELISA

Vor der Analyse der Testproben wurde das CAT-ELISA-Verfahren gültig gemacht. Da die geeigneten Qualitätskontroll-Gewebeproben, die CAT enthalten, nicht zur Verfügung standen, wurden sowohl die innerhalb eines Tages als auch die über die Tage hinweg auftretenden Variationen unter Verwendung der Standard-Kurven ermittelt. Diese Kurven wurden unter Verwendung der CAT-Standards hergestellt, die in dem CAT-ELISA-Ausrüstungssatz mit CAT-Konzentrationen von 0,0, 15,6, 31,25, 62,5, 125, 250 und 500 pg/ml geliefert werden. Die Variation innerhalb eines Tages wurde dadurch ermittelt, dass die Standard-Kurve dreifach hergestellt wurde. Sowohl für die innerhalb eines Tages als auch für die über die Tage hinweg auftretende Variation wurde der Variationskoeffizient (% CV) bei jeder Standardkonzentration berechnet.

Gültigmachung der Gewebe-Extraktionsverfahren

Das Gewebe-Extraktionsverfahren wurde zunächst damit begonnen, dass die verschiedenen Gewebeproben von zwei Kontroll-Kaninchen entnommen wurden, die Dosen von „nackter“ Plasmid-DNA entweder in den Dünndarm oder in den Dickdarm erhalten hatten, der jeweils in drei Abschnitte unterteilt worden war, und wurden getrennt bei – 80° C gelagert. 0,5 ml von eiskaltem Gewebe-Extraktionspuffer (10 mM Tris, pH-Wert 7 – 8; 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 % Triton X-100, 100 µM Leupeptin, 1,0 µM Pepstatin und 0,25 mM PMSF) wurden dem Röhrchen hinzugefügt, das die Gewebeprobe enthielt und vier verschiedene Male (0,6, 1,2 oder 2,4 Minuten) unter Verwendung eines Mini-Bead-Beaters bei 4° C homogenisiert. Das Homogenisat wurde in ein sterilisiertes Mikro-Zentrifugierröhrchen (1,5 ml) übertragen und in einer MSE Micro-

fuge bei 13.000 U/min 20 Minuten lang bei 4° C zentrifugiert. Der Überstand (d.h. der Gewebeeextrakt) wurde in ein sterilisiertes Mikro-Zentrifugierröhrchen (1,5 ml) übertragen und auf Eis gelegt. Eine weitere Probe des Gewebeeextraktes wurde (1 : 20) mit PBS verdünnt und unter Verwendung des BCA-Protein-Untersuchungsverfahrens auf die Protein-Konzentration untersucht. Jede Probe wurde doppelt analysiert und hinsichtlich der Verdünnung korrigiert um die Gesamtprotein-Konzentration (mg/ml) im Gewebeeextrakt zu erhalten.

Das CAT-ELISA-Verfahren wurde für die Analyse von CAT in den Magendarm-Gewebeeextrakten gültig gemacht. Zunächst wurde der Einfluß der Protein-Konzentration auf die Ermittlung der CAT-Konzentration in den verschiedenen Gewebeeextrakten unter Verwendung des CAT-ELISA-Verfahrens ermittelt. Gewebeproben von den Kontroll-Kaninchen (Peyersche Flecken, Enterocyten, Dickdarmgewebe und mesenterische Lymphknoten) wurden in eiskaltem Gewebe-Extraktionspuffer (0,5 ml) wie oben beschrieben extrahiert und wurden darüber hinaus 1,5 Minuten (3 Zyklen mit je 30 Sekunden Homogenisierung und 30 Sekunden Pause) homogenisiert. Nach der Ermittlung der Protein-Konzentration wurden die Gewebeeextrakte mit Sample-Puffer (CAT-ELISA-Ausrüstungssatz) verdünnt, um Extrakt-Lösungen mit Protein-Konzentrationen von ungefähr 0,5, 1,0 und 2,0 mg/ml zu erzeugen. Jedes dieser verdünnten Extrakte wurde mit CAT-Standard (CAT-ELISA-Ausrüstungssatz) gespiked, um End-CAT-Konzentrationen von 25 und 100 pg/ml zu ergeben. Die gespikten Proben wurden dann 2-fach auf die CAT-Konzentration analysiert und die Prozent-Rückgewinnung von CAT in jeder Probe wurde berechnet.

Zweitens wurde der Einfluß des Extraktionsverfahrens auf die Stabilität von CAT in den verschiedenen Geweben ermittelt. Dies wurde dadurch ausgeführt, dass die Gewebeproben von den oben erwähnten Kontroll-Kaninchen (Dickdarmgewebe, Peyersche Flecken und Enterocyten) mit Extraktions-Puffer extrahiert wurden, die CAT-Konzentrationen von 50 oder 200 pg/ml enthielten. Nach Ermittlung der Protein-Konzentrationen wurde jedes Probenextrakt in dem Sample-Puffer (im Verhältnis 1 zu 2 oder 1 zu 4) verdünnt. Jede verdünnte Probe wurde 2-fach auf die CAT-Konzentration analysiert. Nach Korrektur der Verdünnung wurde die Prozent-Wiedergewinnung von CAT in jedem Gewebeeextrakt berechnet.

Analyse der transfizierten Zellen

Zellextrakte der transfizierten Zellen (RAW 264 Makrophagen und C6 Glial) wurden unter Verwendung des Gefrier/Auftau-Verfahrens zubereitet. Die Zellen wurden von der Oberfläche der Platte abgekratzt und in ein steriles Mikrozentrifugen-Röhrchen übergeführt und mit 400 µl vorgekühltem TEN-Puffer (40 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 150 mM Natriumchlorid, pH-Wert 7,8) gut gespült. Die Zellen setzten sich in einer MSE-Mikrozentrifuge bei einem Zentrifugievorgang von 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit (13.000 U/Min) ab. Nach Entfernen des Überstands wurden die Zellen

erneut in 150 µl Tris-Puffer (250 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,8) resuspendiert. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff 5 Minuten lang eingefroren und dann bei 37° C in einem Wasserbad 5 Minuten lang aufgetaut. Der Gefrier/Auftau-Zyklus wurden vier Mal wiederholt. Die Zellsuspension wurde in einer MSE-Mikrozentrifuge 10 Minuten lang bei maximaler Geschwindigkeit (13.000 U/min) zentrifugiert. Der Zelleextrakt (Überstand) wurde in ein frisches Mikrozentrifugen-Röhrchen überführt. Eine Teilmenge des Überstandes wurde unter Verwendung des BCA-Protein-Assays hinsichtlich der Proteinkonzentration analysiert. Die Zelleextrakte wurden (1 zu 5) mit Sample-Puffer (CAT-ELISA-Ausrüstungssatz) verdünnt, der 0,5 mM EDTA und 8 µg/ml Trasylol enthielt und vor der CAT-Analyse bei -80° C gelagert. Jede Zelleextrakt-Verdünnung wurde 2-fach analysiert, um die CAT-Konzentrationen zu ermitteln. Werte von weniger als 15 pg/ml wurden als Null angenommen und Werte, die höher waren als diese Konzentration, wurden in geeigneter Weise hinsichtlich der Verdünnung korrigiert, um die Gesamt-CAT-Konzentration (pg/ml) im Zelleextrakt zu erhalten. Da die Gesamt-Protein-Konzentration in jedem Zelleextrakt unterschiedlich war, wurde die Menge von CAT-Expression in jeder Probe dadurch normalisiert, dass die Gesamt-CAT-Konzentration durch die Gesamt-Protein-Konzentration geteilt wurde.

Analyse der Kaninchengewebe-Proben

Die Extrakte der Kaninchengewebe wurden vor der Analyse auf CAT vorbereitet. Eiskalter Gewebe-Extraktions-Puffer (1 ml) wurde dem Röhrchen hinzugefügt, das die Probe enthielt und es erfolgte eine Homogenisierung unter Verwendung eines Mini-Bead-Beaters bei 4° C über 1,5 Minuten (3 Zyklen je 30 Sekunden Homogenisierung und 30 Sekunden Pause). Das Homogenat wurde in ein sterilisiertes Mikrozentrifugen-Röhrchen (1,5 ml) übergeführt und in einer MSE-Mikrozentrifuge bei 13.000 U/Min 20 Minuten lang bei 4° C zentrifugiert. Der Überstand (d.h. der Gewebeextrakt) wurde in ein sterilisiertes Mikrozentrifugen-Röhrchen (1,5 ml) übergeführt und auf Eis gelegt. Eine Teilmenge des Gewebeextraktes wurde (1 zu 20) mit PBS verdünnt und sofort unter Verwendung des BCA-Protein-Assays auf die Protein-Konzentration untersucht. Jede Probe wurde 2-fach analysiert und hinsichtlich der Verdünnung korrigiert, um die Gesamt-Protein-Konzentration (mg/ml) im Gewebeextrakt zu erhalten.

Eine Teilmenge des Gewebeextrakts wurde in geeigneter Weise unter Verwendung des Sample-Puffers (1 zu 2, 1 zu 4 oder 1 zu 3, 1 zu 6) verdünnt und vor der CAT-Analyse bei -80° C gelagert. Jede Gewebeextrakt-Verdünnung wurde zur Ermittlung der CAT-Konzentration 2-fach analysiert. Werte von weniger als 15 pg/ml wurden als Null angenommen und die Werte, die höher waren als diese Konzentration wurden in geeigneter Weise hinsichtlich der Verdünnung korrigiert, um die Gesamt-CAT-Konzentration (pg/ml) im Gewebeextrakt zu erhalten. Da die Gesamt-Protein-Konzentration in jedem Gewebeextrakt verschieden war, wurde die Menge der CAT-Expression in jedem Gewebe dadurch normalisiert, dass die Gesamt-CAT-Konzentration durch die Gesamt-Protein-Konzentration geteilt wurde.

Hinsichtlich der innerhalb eines Tages auftretenden Variation lagen die CV-Werte für alle Standards innerhalb der akzeptablen Grenzen ($\pm 10\%$). Obwohl für die sich über Tage hinweg erstreckende Variation die CV-Werte nur für Standards am oberen Ende der Kurve (125 bis 500 pg/ml) innerhalb akzeptabler Grenzen lagen ($\pm 20\%$) war der mittlere Korrelationskoeffizient der Standardkurven $0,996 \pm 0,002$. Die ermittelte Mehrtages-Variabilität in der Standardkurve beruhte möglicherweise auf geringen Änderungen in der Inkubationszeit mit dem Substrat im letzten Schritt der Untersuchung und auch auf einer Plattenvariation unterschiedlicher Ausrüstungssätze. Die geringste messbare Konzentration von CAT war 15 pg/ml und die obere Grenze der Untersuchung betrug 500 pg/ml.

Jede Gewebeprobe hatte ähnliche Protein-Konzentrationen nach einer Extraktion über unterschiedliche Zeiten (0,6, 1,2, 2,4 Minuten) was zeigte, dass die Proben in 2,4 Minuten in zufriedenstellender Weise homogenisiert werden konnten.

Die Rückgewinnung von CAT aus gespikten Gewebeextrakten bei Protein-Konzentrationen von 0,5, 1,0 und 2,0 mg/ml war 83 – 100 %. Die Rückgewinnung von CAT aus mit CAT vor der Extraktion gespikten Geweben variierte in verschiedenen Gewebetypen und betrug 50 % oder weniger, wenn die Homogenate Protein-Konzentrationen von 4 mg/ml oder mehr aufwiesen. Daher könnte eine hohe Protein-Konzentration eine Unterbewertung der CAT-Expression in einer Testprobe verursachen. Alle nachfolgenden Ermittlungen wurden unter Berücksichtigung dieses Ergebnisses durchgeführt.

BEISPIEL 2: Zubereitung von Chitosan-Komplexen

Chitosan CL113 wurde von Pronova Biopolymer, Ltd., Großbritannien bezogen. pCAT-DNA-Chitosan-Komplexe mit Verhältnissen von 1:10 und 1:5 (Gewicht/Gewicht) wurden entsprechend dem unten in Beispiel 7 beschriebenen Verfahren durch langsames Hinzufügen von Chitosanlösung zu einer pCAT-DNA-Lösung unter beständigem Rühren zubereitet. Die Größen der sich ergebenden Teilchen betrugen 100 – 200 nm (S) und 300 – 460 nm (L). Die Größe der Teilchen wurde durch die Geschwindigkeit bestimmt, mit der das Chitosan der DNA-Lösung hinzugefügt wurde; je höher die Geschwindigkeit umso kleiner die Teilchen. Die Zubereitungen mit einem Verhältnis 1:10 und einer Teilchengröße von 300 – 460 nm wurde für eine Bewertung in den vier Studien ausgewählt. Die Konzentration von pCAT-DNA in der Zubereitung war 38,677 µg/ml.

Die Größe und die Größenverteilung der pCAT-DANN-Chitosan-Komplexe wurde durch Photonen-Korrelations-Spektroskopie (PCS) unter Verwendung eines Malvern 4700 Submikron-Teilchen-Analyser-Systems (Malvern Instruments, Großbritannien) mit einem PCS 100 Spektrometer ermittelt. Die Proben wurden mit destilliertem Wasser verdünnt und bei 25° C unter einem Streuwinkel von 90° gemessen. Die Größenverteilung wird durch einen Polydispersitäts-Index (PI) gekennzeichnet (Tabelle 1).

Tabelle 1: Eigenschaften der pCAT-Chitosan-Komplexe

Proben Nr.	pCAT: Chitosan ¹	Tatsächliche Größe (nm)	PI ²	Mittleres Zetapotential (mV)
1	1:5, klein	138,3	0,186	28,7
2	1:5, groß	302,2	0,483	30,1
3	1:10, klein	172,5	0,214	39,4
4	1:10, groß	463,9	0,543	39,6

¹ Wie durch die Teilchengrößen-Messung definiert: klein 100 – 200 nm, groß 300 – 500 nm

² Polydispersitätsindex

Das Zetapotential der pCAT-DNA-Chitosan-Komplexe wurde unter Verwendung der Technik der elektrophoretischen Laser-Doppler-Spektrometrie ermittelt. Das Medium für die Zetapotential-Messung war 1 mM M HEPES-Puffer mit einem pH-Wert von 7,4 oder destilliertes Wasser. Die Probe wurde unter Verwendung eines Zeta Sizers (Modell 4, Malvern Instruments, Großbritannien) (Tabelle 1) untersucht. Die Wechselwirkungswärme, die erzeugt wurde, wenn DNA mit den Chitosan in Wechselwirkung trat, wurde durch isothermale Titrations-Mikrokalorimetrie unter Verwendung eines Thermal Activity Monitors (TAM, Thermometric, Model 2277, Schweden) gemessen. Die Mikrokalorimetrie-Untersuchungen wurden in der Weise ausgeführt, dass langsam Chitosan-Lösungen (0,05 – 0,4 %) mit einer Geschwindigkeit von 10 µl pro 11 Minuten mit einer Gesamtzahl von 35 Injektionen aus einer Präzisionsspritze zu einer pCAT-DNA-Lösung (2 ml; 40,5 µg/ml) hinzugefügt wurden. Zur Kontrolle wurde die entsprechende Chitosan-Lösung zu Wasser hinzugefügt. Jede Hinzufügung des Titriermittels führte zur Entwicklung (exothermer Prozess) oder Absorption (endothermer Prozess) von Wärme. Die Wärme, die durch Thermosäulen geleitet wurde, wurde als eine Reihe von Spitzen aufgezeichnet. Der für die Kontrolle erhaltene Wert wurde verwendet, um die Wärme der Verdünnung abzuziehen.

Die kalibrierte Wärmefluss-Kurve von mit Chitosan titrierter pCAT-DNA zeigte zwei Gruppen des Wärmeaustausches (Fig. 1). Die erste Gruppe ist exotherm und die zweite ist endotherm. Die erste Gruppe stammt von der Ionen-Wechselwirkung zwischen positiv geladenem Chitosan und negativ geladener pCAT-DNA, da das Verhältnis von pCAT-DNA zu Chitosan für die erste Gruppe gleich $0,79 \pm 0,10$ (Gewicht/Gewicht) ist, was sehr nahe an den Verhältnis von pCAT-DNA zu Chitosan liegt, wenn ihre Einheit des entgegengesetzten Ladungsverhältnisses 1:1 ist. Die zweite Gruppe stammt von der Änderung der Komplexstruktur.

Ein fluorometrisches Verfahren wurde verwendet, um ein schnelles Verfahren zur Charakterisierung der Kondensation der pCAT-DNA durch kationische Polymere zu liefern. Dies wurde dadurch bewerkstelligt, dass Ethidium-Bromid (EtBr) in einer Küvette (Referenz) zu Wasser und eine pCAT-DNA-Lösung und Ethidium-Bromid in einer zweiten

Küvette (Test) zu Wasser hinzugefügt wurden. Die Fluoreszenz der Referenz-Küvette wurde unter Verwendung des Perkin-Elmer 3000 Fluorescence Spektrometers auf Null gesetzt. Die optische Emissionswellenlänge war 591 nm und die optische Erregungswellenlänge war 366 nm. Die von der Test-Küvette erhaltene Fluoreszenz wurde gemessen. Dann wurden Chitosan-Proben (C-110 und C-210) in sehr kleinen Portionen zur Test-Küvette unter konstantem Rühren hinzugegeben und die Fluoreszenz-Ableseung wurde drei Mal vorgenommen, wobei zwischen einer jeden Ableseung zur Null-Zelle zurückgekehrt wurde. Der Mittelwert der drei Ableseungen wurde dann aufgezeichnet. In jeder Verdichtungsuntersuchung wurden 8 µg pCAT-DNA verwendet. Die durch Chitosan bewirkte Verdichtung von DNA wurde mit der verglichen, die durch ein kationisches Standard-Polymer (Poly-L-Lysin) bewirkt wird.

Die pCAT-Chitosan-Komplexe mit den Verhältnissen 1:5 und 1:10 waren beide positiv geladen (Tabelle 1). Es zeigte sich, dass die Komplexe mit dem kleineren pCAT-DNA/Chitosan-Verhältnis (1:10) stärker positiv geladen waren als die Komplexe mit dem entsprechenden höheren Verhältnis (1:5). Diese Beobachtung entsprach den Erwartungen, da Chitosan ein kationisches Polymer ist, und es wurde tatsächlich ein fortschreitender Anstieg des Zetapotentials (von negativ zu positiv) mit dem Anstieg des hinzugefügten Chitosans gefunden.

BEISPIEL 3: Zell-Transfektions-Studien

Die verwendeten Zelllinien waren Maus-Leukämie-Monozyten-Makrophagen (RAW 264) und Ratten-Glial-Tumor (C6). Die RAW 264 Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium zum Wachsen gebracht, das 10 % fötales Rinderserum (FBS) und 2 mM Glutamin enthielt, während die C6 Zellen in Ham's F12 Medium zum Wachsen gebracht wurden, das 10 % FBS und 2 mM Glutamin enthielt. Beide Zelllinien wurden in 25 ml des entsprechenden Mediums in Falcon-Kolben mit 75 cm² bei 37° C und unter 5 % CO₂ wachsen gelassen. Nachdem die Zellen sub-konfluent wurden, wurden sie weiter verarbeitet.

Probenzubereitung

Die in diesen Untersuchungen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Transfektion von RAW-264 und C6-Zelllinien bewerteten Proben wurden in folgender Weise zubereitet:

1. Wässrige pCAT-DNA (2 µg) wurde mit OptiMEM auf 1 ml aufgefüllt.
2. Wässriger pCAT-DNA/Lipofectamin (LF)-Komplex:
 - C6-Zelllinie 20 µl OptiMEM, die 2 µg DNA enthielten, wurden mit 20 µl OptiMEM gemischt, die 1,2 µg LF enthielten, und bei Zimmertemperatur 30 Minuten inkubiert, um eine Komplexbildung zu ermöglichen. Das Volumen wurde unmittelbar vor der Transfektion mit OptiMEM auf 160 µl eingestellt.

- RAW-Zelllinie: 20 µl OptiMEM, die 2 µg DNA enthielten, wurden mit 100 µl OptiMEM gemischt, die 10 µg LF enthielten, und bei Zimmertemperatur 30 Minuten inkubiert, um eine Komplexbildung zu ermöglichen. Das Volumen wurde unmittelbar vor der Transfektion mit OptiMEM auf 1 ml eingestellt.
- 3. pCAT-DNA-Komplexe wurden in 1 ml des Vollkulturmediums (ohne Antibiotika) erneut suspendiert.
- 4. Zur Kontrolle wurde Kulturmedium in den Zellen getestet.

Die Mengen der vier Chitosan-Komplex-Zubereitungen, die in den Transfektions-Untersuchungen verwendet wurden, sind in Tabelle 2 dargestellt. Alle Proben wurden in jeder Zelllinie 4-fach getestet, wobei das hier kurz beschriebene Verfahren verwendet wurde. Die Zellen wurden in 25 ml Medium in einem 75 cm² Falcon-Kolben wie oben beschrieben bis zur Sub-Konfluenz wachsen gelassen. Jede Mulde einer 24 Mulden umfassenden Kulturplatte wurde mit 1 ml (5×10^5 Zellen/ml) der Zellsuspension in Vollkulturmedium geimpft und über Nacht bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert, so dass sie ungefähr zu 80 % konfluent wurden. Nach dem Ansaugen des Mediums wurden die Transfektionssubstrate langsam der Einzellschicht hinzugefügt und 5 Stunden lang bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert. Wenn die Zellen mit Mikroteilchen transfiziert wurden, wurde die Platte alle 30 Minuten gerüttelt. Die Transfektion wurde dadurch beendet, dass das Transfektionssubstrat durch 1 ml Vollkulturmedium ersetzt wurde. Wenn Mikroteilchen verwendet wurden, wurden die Zellen sorgfältig mit PBS gewaschen, bis die Monoschicht teilchenfrei war. Die Platte wurde 48 Stunden inkubiert, bevor die Zellen für die CAT-Analyse extrahiert wurden.

Tabelle 2: Mengen der bei den Transfektionsstudien verwendeten Chitosan-Zubereitungen

Zelllinie	Zubereitung (CAT-DNA-Chitosan-Verhältnis) ¹	Gewicht der Mikroteilchen	Menge der den Zellen verabreichten DNA (µg)
C6 und RAW 264	1:5, klein	14,81 µg	3
C6 und RAW 264	1:5, groß	14,81 µg	3
C6 und RAW 264	1:10, klein	29,63 µg	3
C6 und RAW 264	1:10, groß	29,63 µg	3

¹ Wie durch die Teilchengrößenmessung definiert: klein 100 – 200 nm, groß 300 – 500 nm.

Die in Fig. 2 dargestellten Ergebnisse zeigten, dass alle Chitosan-DNA-Komplexe die Zellen transfizierten. Es gab keinen Unterschied zwischen den verschiedenen Systemen.

BEISPIEL 4: Tierstudien

Die Verabreichung von Plasmid-DNA-Zubereitungen an den Magendarmtrakt von Kaninchen umfasste eine Lapratomie (chirurgisches Einschneiden in den Bauch) und die Erholung der Kaninchen. Vor jedem Untersuchungstag wurde Fell vom Bauchbereich des entsprechenden Kaninchens unter Verwendung einer Haarschneidemaschine entfernt. An jedem Untersuchungstag wurden die entsprechenden Kaninchen unter Verwendung einer Boyles-Vorrichtung/Halothan-Anästhesie anästhesiert. Die Anästhesie wurde während des gesamten Vorgangs aufrechterhalten. Es wurde ein Mittellinien-Schnitt mit einer Länge von 5 bis 8 cm durch die Haut gemacht, um den Abdomen freizulegen. Ein zweiter Mittellinien-Schnitt mit einer Länge zwischen 5 und 8 cm wurde durch die White-Linie (zur Minimierung des operativen Blutverlustes) gemacht, die in Längsrichtung am Bauch des Kaninchens entlang läuft, um den Bauchhohlraum zu eröffnen. Die Gedärme wurden freigelegt und der Dickdarm und der obere Teil des Dünndarms mit einer möglichst geringen Berührung der Därme identifiziert. Es war erforderlich, einen Teil der Därme herauszuholen, um einen klaren Zugang zum Dünndarm und Dickdarm für die Verabreichung einer Dosis zu erhalten.

Bei der Verabreichung an den Dünndarm wurde die Dosis an den oberen Teil des Dünndarms in einem Abstand von ungefähr 10 cm von der Verbindung mit dem Magen verabreicht. Bei einer Verabreichung an den Dickdarm wurde die Dosis dem Dickdarm in einem Abstand von ungefähr 5 cm von der Verbindung mit dem Blinddarm verabreicht.

Bei der Verabreichung einer Dosis wurde ein geeignetes Dosis-Volumen direkt in den Hohlraum des entsprechenden Teils des Magendarmtraktes unter Verwendung einer sterilen Spritze und Nadel zugeführt. Beim Herausziehen der Nadel wurde das Gewebe mit einem Tropfen Zyanoacrylat-Kleber versiegelt, um ein Austreten der Dosis zu verhindern. Es wurde darauf geachtet, dass sichergestellt war, dass der Zyanoacrylat-Kleber trocknete, bevor die hervorgeholten Därme in den Bauchhohlraum zurückgebracht wurden, und dass die Därme ungefähr in ihrer natürlichen Position lagen. Der Bauchhohlraum wurde mit zwei Schichten von Nähten geschlossen, eine durch die Bauchmuskulatur und die zweite durch die Haut. Die Kaninchen wurden in einen geeigneten Käfigraum zurückgebracht und man ließ sie sich von den Wirkungen der Narkose erholen.

Ungefähr 72 oder 48 Stunden nach der Dosis-Verabreichung der Zubereitung wurden die Kaninchen durch eine Überdosis von Pentobarbiton-Natrium (ungefähr 0,5 ml/kg) getötet, das über eine Ohr-Randvene verabreicht wurde. Es wurde ein Mittellinien-schnitt im Bauch durchgeführt, um den Inhalt des Bauchhohlraums freizulegen. Der Versorgungskanal von Dünndarm bis zum Rektum wurde aus dem Bauchhohlraum dadurch entfernt, dass der Dünndarm in der Nähe der Verbindung mit dem Magen und das Rektum in der Nähe des Afters durchgeschnitten wurden.

Entnahme von Geweben aus dem Dünndarm

Der Dünndarm von der Verbindung mit dem Magen bis zum Blinddarm wurde in drei Bereiche von ungefähr gleicher Länge eingeteilt, die als vorderes, mittleres und hinteres Segment bezeichnet wurden. Für jedes Kaninchen, das eine Dosis in den Dünndarm erhalten hatte, wurden insgesamt acht Gewebeproben entnommen:

- **Mesenterische Lymphknoten (MLN):** Diese Lymphknoten wurden unter Bildung einer kompakten Masse, welche die linke Seite der oberen mesenterischen Arterie abdeckte, aggregiert. Diese aggregierten Lymphknoten wurden in einer Probe gesammelt.
- **Peyer'sche Flecken (PP):** Diese wurden in folgender Weise vom Dünndarm gesammelt: Ein Flecken der am nächsten an der Verabreichungsstelle lag (PP1), ein Flecken im mittleren Segment (PP2), ein Flecken im hinteren Segment (PP3). Jeder Peyer'sche Flecken wurde in der Weise gewonnen, dass zuerst der entsprechende Abschnitt des Dünndarms entfernt und dann der Peyer'sche Flecken isoliert wurde.
- **Enterozyten (ENT):** Darmgewebe wurde gewonnen, wobei sichergestellt wurde, dass es keine Peyer'schen Flecken enthielt. Ein Abschnitt des Darms wurde in der Nähe der Stelle der Entnahme des ersten Peyer'schen Flecken entnommen (ENT1), einer im mittleren Abschnitt (ENT2) und einer im hinteren Abschnitt (ENT3). Aus jedem Darmabschnitt wurde eine Gewebeprobe isoliert, die eine Querschnittsfläche besaß, die ungefähr gleich der ist, die von einem Peyer'schen Flecken eingenommen wird.
- **Dickdarmgewebe (COL):** Ein Gewebesegment wurde vom Rektum entfernt und eine Gewebeprobe wurde isoliert, die eine Querschnittsfläche ungefähr gleich der hatte, die von einem Peyer'schen Flecken eingenommen wird.

Entnahme von Geweben aus dem Dickdarm

Der Dickdarm wurde von der Verbindung mit dem Blinddarm bis zum Rektum in drei Bereiche von ungefähr gleicher Länge eingeteilt, die als vorderer, mittlerer und rektaler Bereich bezeichnet wurden. Von jedem Kaninchen, das eine Dosis in den Dickdarm erhalten hatte, wurden insgesamt vier Gewebeproben entnommen:

- **Mesenterische Lymphknoten (MLN):** Diese aggregierten Lymphknoten wurden in einer Probe gesammelt.
- **Dickdarmgewebe (COL):** Ein Segment des Gewebes wurde vom vorderen Abschnitt des Dickdarms in der Nähe der Verabreichungsstelle entfernt (COL1), eine vom mittleren Segment (COL2) und eine vom rektalen Segment (COL3). Für jedes Segment wurde eine Gewebeprobe isoliert, die eine Querschnittsfläche be-

18.07.02

saßt, die ungefähr gleich derer ist, die von einem Peyer'schen Flecken eingenommen wird.

Nach dem Entfernen der Gewebeproben von jedem Kaninchen wurden die Instrumente mit sterilem 0,9 %-igem Natriumchlorid gespült, um eine Überkreuz-Verschmutzung zu vermeiden. Nach dem Entfernen wurden die Gewebeproben sorgfältig mit 0,9 %-igem Natriumchlorid gewaschen und in eine Petri-Schale eingebracht. Jede Gewebeprobe wurde unter Verwendung eines sterilen Skalpells in zwei Proben von ungefähr gleicher Größe aufgeteilt und jede dieser Proben wurde weiter in drei bis vier Stücke zerschnitten. Stücke von jeder Gewebeprobe wurden in ein sterilisiertes Schraubkopf-Röhrchen (1,5 ml) eingebracht, das ungefähr 250 µl von Silizium-Zirkonium-Kügelchen mit einem Durchmesser von 2,5 nm enthielt, und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden auf Trockeneis vor einer Lagerung bei -80°C für die CAT-Analyse gelagert.

Die Einzelheiten der von den verschiedenen untersuchten Zubereitungen erhaltenen Ergebnisse, nämlich der einfachen pCAT-DNA-Lösung, der mit DOTMA zubereiteten pCAT-DNA und des Chitosan-DNA-Komplexes sind in Tabelle 3 wiedergegeben. Man sieht, dass die Kontrolllösung zu keinerlei Expression in einem der untersuchten Gewebe führte. Die pCAT-DNA-DOTMA-Zubereitung führte zu einer gewissen Expression aber nicht in allen Geweben. Überraschender Weise führte der Chitosan-DNA-Komplex zu einer Expression in nahezu allen untersuchten Geweben. Die mittleren Daten werden in Fig. 3 miteinander verglichen. Der überraschende Effekt, der sich mit dem Chitosan-Komplex ergab, ist deutlich zu sehen.

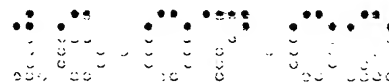


Tabelle 3: Zusammenfassung der CAT-Konzentration von Gewebeextrakten von Kaninchen, bei denen eine Verabreichung in den Magendarmtrakt mit pCAT-DNA bei 100 µg pro Tier (Mittelwerte) erfolgte

Zubereitungs- Bestandteile	Dickdarmprobe	CAT-Konzentra- tion pg/mg Pro- tein	Dünndarmprobe	CAT-Konzentra- tion pg/mg Pro- tein
pCAT-Lösung	COL2	0,000	PP3	0,000
	MLN	0,000	ENT1	0,000
			MLN	0,000
pCAT:DOTMA	COL1	0,000	PP1	1,687
	COL2	0,000	PP2	0,000
	COL3	0,000	PP3	3,919
	MLN	0,000	ENT1	2,533
			ENT2	0,000
			ENT3	0,000
			Col	1,185
			MLN	1,151
pCAT:Chitosan	COL1	1,046	PP1	8,086
	COL2	0,000	PP2	9,700
	COL3	0,000	PP3	13,143
	MLN	2,170	ENT1	4,605
			ENT2	4,824
			ENT3	8,274
			COL1	1,652
			MLN	0,000

BEISPIEL 6 : Kontrollstudie

Die Bedeutung der Teilchengröße des Chitosansystems zum Bewirken einer guten Transfektion sowohl in vitro als auch in vivo wurde unter Verwendung von Chitosan-Mikrokügelchen ermittelt, die durch einen Sprühtrocknungsprozess unter Verwendung einer 0,5 %-igen Lösung von Chitosan CL113 in Essigsäure zubereitet wurden. Ein LabPlant SD05-Sprühtrockner wurde verwendet. pCAT-DNA wurde an der Oberfläche dieser Teilchen dadurch adsorbiert, dass eine 10 %-ige wässrige Suspension von Mikrokügelchen der pCAT-DNA-Lösung unter ständigem Rühren hinzugefügt wurde. Eine Adsorptions-Effizienz von 97 % wurde erzielt. Die Konzentration von pCAT-DNA in der Zubereitung betrug 47,8 µg/ml. Die Transfektion der C6-Zelllinie wurde wie in Beispiel 2 durchgeführt. Dies bedeutete eine Verabreichung von ungefähr 1 µg DNA an die Zelle. Die gefundene mittlere CAT-Konzentration war ungefähr 100 pg/mg Protein bei der Verwendung von 0,3 mg Teilchen. Diese Mikrokügelchen hatten eine mittlere Teilchengröße (mittlerer Volumendurchmesser) von 5,5 µ. Die wie in Beispiel 3 durchgeführten Tieruntersuchungen, bei denen vier Tiere pro Gruppe sowohl für eine Dün-

darm- als auch eine Dickdarm-Verabreichung verwendet wurden, zeigten niedrigere Expressions-Pegel als bei den Chitosan-DNA-Komplexen.

BEISPIEL 7: Bewertung des Chitosan-pCAT-DNA-Komplexes nach einer nasalen Verabreichung an Ratten

Bei dieser Untersuchung wurde ein Plasmid-DNA-Konstrukt (pCAT-DNA) verwendet, welches das Reporter-Gen für Chloramphenicolacetyl-Transferase (CAT) trägt und einen Zytomegalovirus-Promoter enthält. Chitosan-pCAT-DNA- und Lipofectin®-pCAT-DNA-Komplexe in flüssigen Zubereitungen wurden nach einer nasalen Verabreichung an Ratten ausgewertet.

(1) Zubereitung des Chitosan-pCAT-DNA-Komplexes

1A Der Chitosan-pCAT-DNA-Komplex wurde dadurch zubereitet, dass 1 ml Chitosan (4 mg/ml) zu 10 ml pCAT-DNA-Lösung (40 µg/ml) unter Rühren mit einem Magnetrührer hinzugefügt wurden.

1B 1 %-ige Mannitol-Lösung (0,4 ml) wurde dem Chitosan-pCAT-DNA-Komplex hinzugefügt und gefriergetrocknet.

1C Der gefriergetrocknete Komplex wurde in 0,8 ml ultra-reinem Wasser erneut suspendiert. Die Endkonzentration des pCAT-DNA betrug 0,5 mg/ml und die des Chitosans betrug 5 mg/ml in der Zubereitung (d.h. DNA:Chitosan = 1:10).

(2) Zubereitung des Lipofectin®-DNA-Komplexes

2A Lipofectin® (350 µl, 350 mg) wurde tropfenweise unter Rühren zu 220 µl pCAT-DNA (175 µg) hinzugefügt.

2B Die Mischung wurde bei Raumtemperatur 15 Minuten lang inkubiert.

2C Die Endkonzentration von pCAT-DNA war 307 µl/ml und die des Lipofectin® war 614 µg/ml (d.h. das Verhältnis DNA: Lipofectin® war gleich 1:2)

(3) Untersuchungen an Ratten

3A Die beiden in der oben beschriebenen Weise (Abschnitte 1 und 2) hergestellten Zubereitungen wurden intranasal Gruppen von männlichen Wistar-Ratten in folgender Weise verabreicht:

Gruppe 1: 100 µl (50 µl pro Nasenloch) Chitosan-pCAT-DNA-Komplex wurden drei Ratten verabreicht (pCAT-DNA-Dosis = 100 µg)

Gruppe 2: 100 µl (50 µl pro Nasenloch) Lipofectin®-pCAT-DNA-Komplex wurden fünf Ratten verabreicht; (pCAT-DNA-Dosis = 61,4 µg).

3B Vor der Dosis-Verabreichung wurden die Ratten mit 0,4 ml/kg Hypnorm sediert, das intramuskulär verabreicht wurde. Dies sollte die Tiere ruhig stellen und den Stress der Tiere während der Verabreichung vermindern. Eine Aufrechterhaltung der Ruhigstellung der Tiere für 1 bis 2 Stunden sollte eine adäquate Kontaktzeit zwischen den flüssigen Dosen und der Nasenschleimhaut ermöglichen. Die Tiere wurden während des Vorgangs warm gehalten (ungefähr 38° C).

3C Nach der Ruhigstellung wurden den Tieren unter Verwendung einer Nadel und Hamilton-Spritze, die an einem geeigneten Stück eines Polythen-Röhrchens befestigt war, 50 µl der Zubereitung zuerst in das linke Nasenloch und nach 5 Minuten in das rechte Nasenloch verabreicht. Man ließ die Tiere auf einer gewärmten Platte 60 Minuten lang mit dem Bauch nach oben ruhen.

(4) Entfernung des Rattengewebes

Ungefähr 72 Stunden nach der Verabreichung der Dosis wurden die Tiere durch eine Überdosis von Pentopbarbitonnatrium getötet, das intravenös verabreicht wurde. Die Nasenschleimhautgewebe sowohl rechts als auch links wurden entfernt, und danach auch die mandibularen Lymphknoten, die Speiseröhre und die Lungen. Jede Gewebeprobe wurde mit isotonomischer Kaliumchloridlösung gespült und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden bei -80° C gelagert.

(5) Extraktion der Gewebe

5A Vor der Extraktion wurden die Gewebe schnell aufgetaut und in Röhrchen übergeführt, die 300 µl Zirkonium/Silizium-Kügelchen mit einem Durchmesser von 2,5 mm enthielten. Die Gewebe wurden in 0,5 ml Extraktionspuffer (10 mM Tris, pH-Wert 7,8, 150 mM Natriumchlorid, 1 mM EDTA, 0,5 % Triton X-100, 1,0 µM Pepstatin, 100 µM Leupeptin und 0,25 mM PMSF) unter Verwendung eines Mini-Bead-Beaters homogenisiert (5 Zyklen von je 30 Sekunden Homogenisierung und 30 Sekunden Pause).

5B Die Homogenate wurden in Mikrozentrifugen-Röhrchen überführt und bei 13.000 U/Min 20 Minuten lang bei 4° C zentrifugiert. Die Überstände wurden in Mikrozentrifugen-Röhrchen überführt und zeitweilig auf Eis gelagert.

(6) Protein-Analyse

Die Gewebeextrakte wurden im Verhältnis 1 zu 20 mit phosphatgepufferter Salzlösung verdünnt und die Protein-Konzentration wurde unter Verwendung des Pierce-BCA-

Protein-Assays ermittelt. Die Gesamt-Protein-Konzentration in jedem Gewebeextrakt wurde nach Korrektur der Verdünnung berechnet.

(7) CAT-Analyse

7A Am Tag der Zubereitung wurden die Gewebeextrakte in geeigneter Weise mit dem Proben-Puffer verdünnt, der mit dem CAT-ELISA-Ausrüstungssatz (Lieferant: Boehringer Mannheim) geliefert wird. Die verdünnten Proben wurden bei -80°C gelagert.

7B Am Tag der Analyse wurden die Probenverdünnungen schnell aufgetaut und es erfolgte die CAT-ELISA-Analyse mit Hilfe des erwähnten Ausrüstungssatzes unter Beachtung der vom Lieferanten vorgegebenen Anweisungen.

7C Die Gesamt-CAT-Konzentration in jedem Gewebeextrakt wurde nach Durchführung einer Verdünnungs-Korrektur berechnet (Tabelle 4).

7D Die Menge der CAT-Expression in jedem Gewebe wurde dann als pg CAT pro ml Protein dargestellt.

(8) Ergebnisse

8A Die Ergebnisse zeigen, dass nach einer nasalen Verabreichung von Chitosan-pCAT-DNA CAT in allen analysierten Geweben exprimiert wird. Die mandibularen Lymphknoten und die nasalen Schleimhautgewebe scheinen CAT besser zu exprimieren als die Speiseröhre und die Lungen.

8B Obwohl die CAT-Expression in den Lungen nicht besonders hoch ist, wenn die Zubereitung intranasal verabreicht wird, zeigen die Ergebnisse an, dass die Lungen das Potential haben, mit DNA transfiziert zu werden.

8C Es wurde erwartet, dass die Lipofectin®-pCAT-DNA-Zubereitung eine wirksame Transfektion ergeben sollte. Es zeigte sich jedoch, dass die nasale Verabreichung dieser Zubereitung zu einer sehr geringen CAT-Expression in den verschiedenen Geweben führte. Es gab lediglich einen gewissen Hinweis auf eine CAT-Expression in der Speiseröhre und im Lungengewebe. Dies war möglich, weil das Verhältnis von Lipofectin® zu DNA sehr gering war (d.h. 2:1).

(9) Schlussfolgerungen

9A Aus dieser Studie kann gefolgert werden, dass der nasale Weg das Potential für eine DNA-Verabreichung besitzt.

9B Obwohl es nicht möglich war, die Menge der Zubereitung abzuschätzen, die bei dieser Studie die Lungen erreichte, zeigt die Expression von CAT in den Lungengewe-

15.07.02

ben an, dass dort ein Potential für eine pulmonare Abgabe von DNA über den Nasenweg oder möglicherweise direkt über den pulmonaren Weg besteht.

Tabelle 4: CAT-Konzentration von Gewebeextrakten von Ratten, denen intranasal Chitosan-pCAT-DNA mit 100 µg oder Lipofectin®-pCAT-DNA mit 61,4 µg pCAT-DNA je Tier verabreicht worden war

Probe	CAT-Konzentration (pg/mg Protein)			
	Chitosan-pCAT-DNA (Gruppe 1)		Lipofectin®-pCAT-DNA (Gruppe 2)	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
Nasenschleimhautgewebe	9,38	8,39	0,00	0,00
Mandibuläre Lymphknoten	13,72	21,24	0,00	0,00
Luftröhre	4,22	7,31	2,55	3,37
Rechte Lunge	4,32	4,95	0,37	0,82
Linke Lunge	2,36	0,91	0,00	0,00

15.07.02

697 12 110.0-08

Patentansprüche

1. Verwendung einer Zusammensetzung, die einen partikulären Komplex von Chitosan und Nukleinsäure umfaßt, wobei der Komplex eine Größe zwischen 10 nm und 1 µm besitzt und eine Oberflächenladung aufweist, bei der Herstellung eines Medikamentes für die Abgabe der Nukleinsäure an eine epitheliale Oberfläche eines Säugetiers oder Menschen, wobei die Nukleinsäure exprimiert werden kann und einen antientzündlichen Wirkstoff, einen antiinfektiösen Wirkstoff, Sucrose-Isomaltase, Laktase-Phlorizinhydrolase, Maltase-Glukoamylase, einen medikamentösen Wirkstoff oder ein Gegenmittel für die Behandlung von Dickdarmkrebs kodiert.
2. Verwendung nach Anspruch 1, bei der unter der Voraussetzung, daß die Nukleinsäure DNA ist, die Oberflächenladung der Zusammensetzung oberhalb von +10 mV für DNA/Chitosan-Verhältnisse zwischen 1:1 und 1:6 und oberhalb von +20 mV für alle anderen DNA/Chitosan-Verhältnisse liegt.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, bei der die Nukleinsäure DNA ist.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bei der die Nukleinsäure einen anti-entzündlichen Wirkstoff kodiert.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bei der die Nukleinsäure einen anti-infektiven Wirkstoff kodiert.
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bei der die Nukleinsäure Sucrose-Isomaltase, Laktase-Phlorizinhydrolase oder Maltase-Glukoamylase kodiert.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bei der die Nukleinsäure einen medikamentösen Wirkstoff oder ein Gegenmittel für die Behandlung von Dickdarmkrebs kodiert.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, bei der der Komplex an die Oberfläche eines größeren Mikrokügelchens gebunden ist.

15.07.02

9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, bei der die epitheliale Oberfläche der Magen-Darm-Trakt, der Dünndarm, der Dickdarm, das dem Darm zugeordnete lymphoide Gewebe, die Nasenschleimhaut, das der Nase zugeordnete lymphoide Gewebe, die Vagina, der Rachenhohlraum, die Speiseröhre, das Rektum, das Auge oder das Innenohr ist oder einen Bereich der Lunge umfaßt.
10. Verwendung nach Anspruch 9, bei der ein schleimlösender Wirkstoff, Lektin, Adhesin oder Invasin mit verabreicht werden soll.
11. Verwendung nach Anspruch 6 bei der Behandlung von Dissaccharid Intoleranz.

0994726

16.07.02

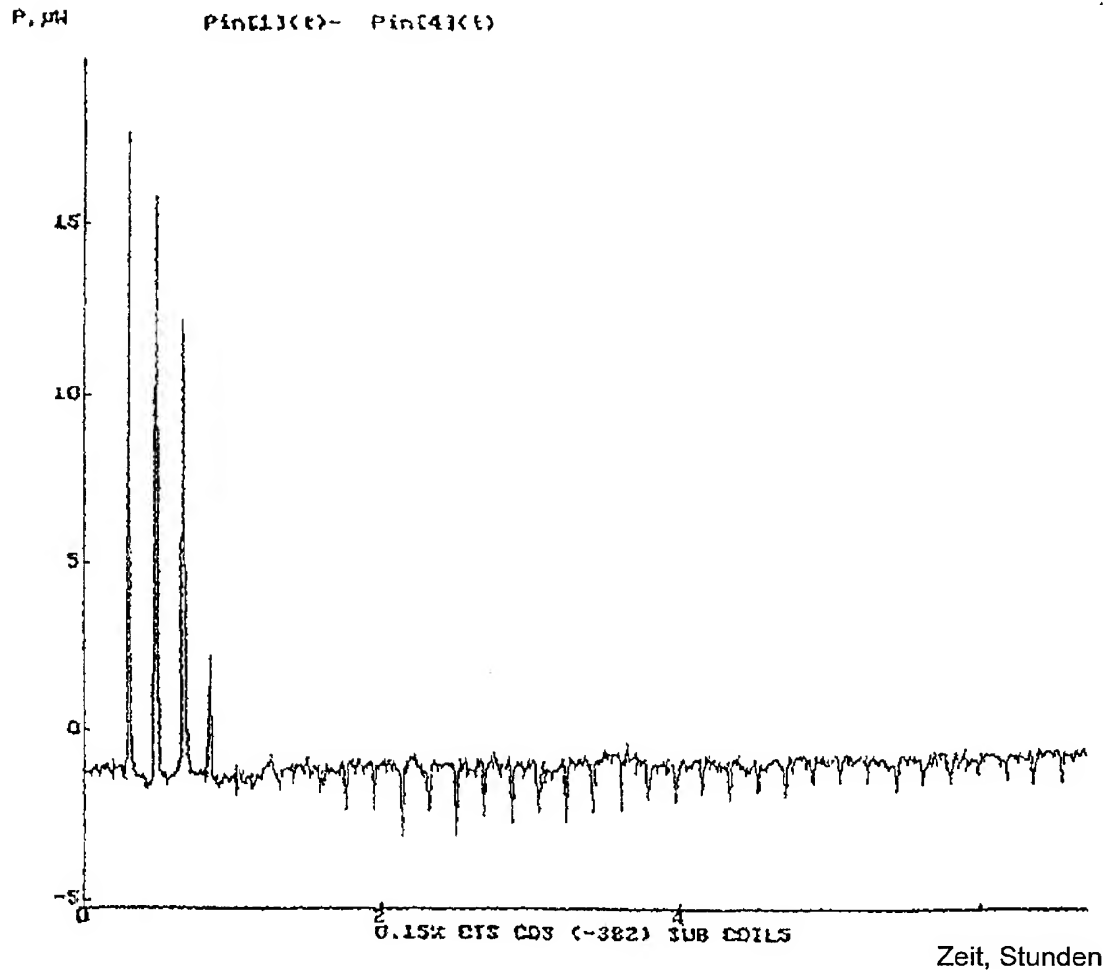


Fig. 1

16.07.02

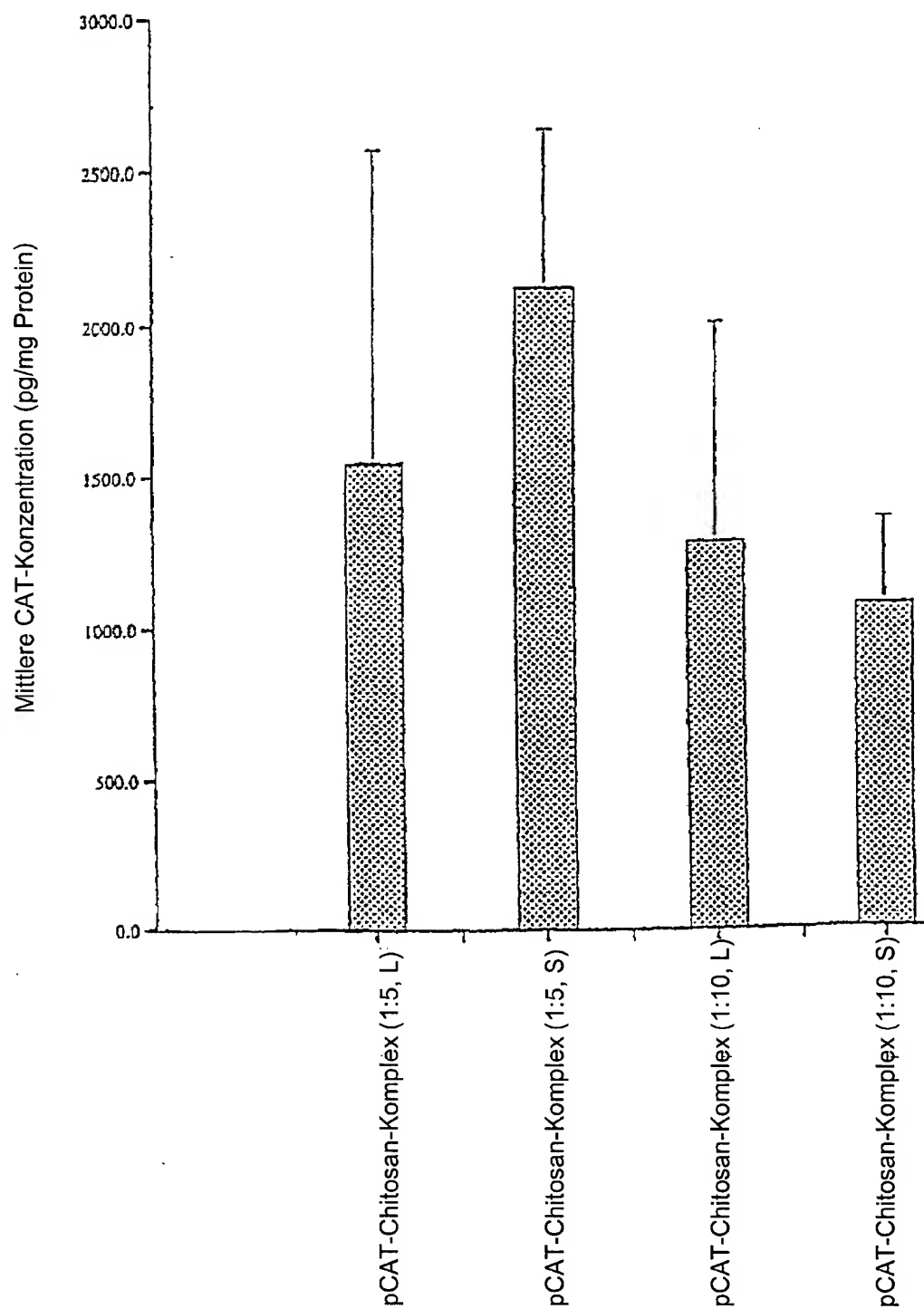


Fig. 2

18.07.02

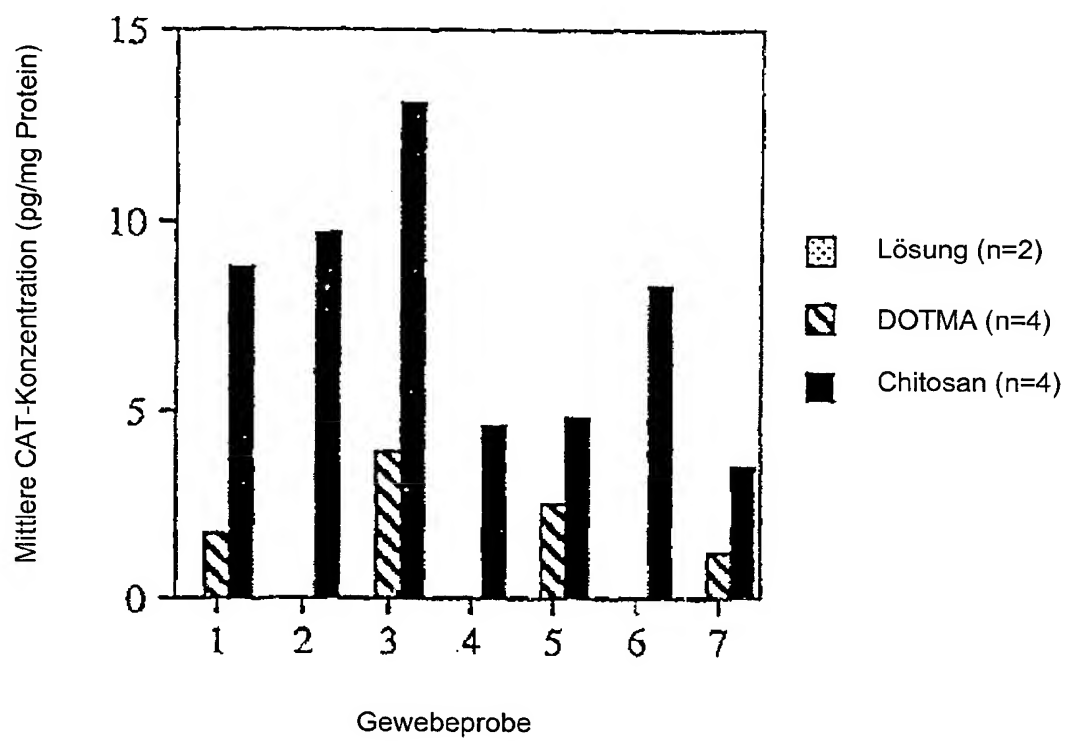


Fig. 3